研究用

製品コード PH016
製品コード PN016

TaKaRa

PrimerArray®シリーズ

PrimerArray® Embryonic Stem Cells

説明書

製品名	製品コード
PrimerArray® Embryonic Stem Cells (Human)	PH016
PrimerArray® Embryonic Stem Cells (Mouse)	PN016

v201209Da

PrimerArray Embryonic Stem Cells は、幹細胞の多分化能と自己増幅能に関連する一群の遺伝子の発現解析を行うためのリアルタイム RT-PCR 用プライマーセットです。ES 細胞の未分化 / 分化で発現が変動する 88 種類の遺伝子と 8 種類のハウスキーピング遺伝子のプライマーが搭載されており、相対定量法によりコントロールサンプルと未知サンプルを比較して発現量に変動がある遺伝子を一度にスクリーニングすることができます。各プライマーセットはリアルタイム RT-PCR で良好に反応することを確認しています。解析には、PrimerArray AnalysisTool for Embryonic Stem Cells ＊1 または Multiplate RQ ＊2 が利用できます。なお、発現変動が認められた遺伝子に関しては、個々のプライマーを別途ご購入いただき、より詳細な解析を行うことも可能です。

＊1： タカラバイオウェブカタログの本製品のページからダウンロードしてご使用いただけます。
URL：http://www.takara-bio.co.jp/primerarray_tool2/
コントロールサンプルと 1 種類の未知サンプルの比較解析が可能です。

＊2： Thermal Cycler Dice Real Time System *II* MRQ（製品コード TP960）、Thermal Cycler Dice Real Time System Single MRQ（製品コード TP870）に搭載されています。コントロールサンプルと複数種類の未知サンプルの比較解析が可能です。なお、Multiplate RQ で解析できるのは Thermal Cycler Dice Real Time System シリーズで取得したデータのみです。

【操作の流れ】

RNA 抽出からデータ解析までの操作フローを以下に示します。（ ）内は 1 回のリアルタイム PCR 実験に要する時間の目安で、全工程は約 2.5 ～ 3.5 時間で終了します。逆転写反応までの操作は複数のサンプルについてまとめて行うことができ、合成した cDNA は－ 20℃で凍結保存し、後の実験に用いることも可能です。

～操作フロー～

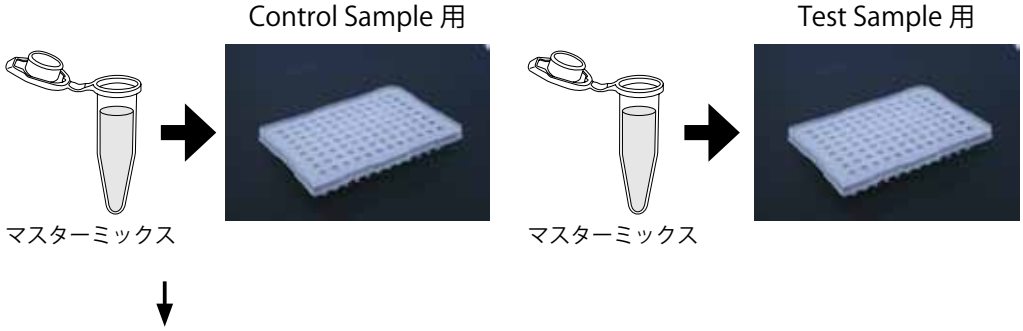
RNA 抽出（約 30 分）
実験材料から RNA を抽出し、DNase I 処理を行います。
1 回の実験に約 2.5 μg の total RNA を使用します。

↓

逆転写反応（約 20 分）
PrimeScript RT Master Mix（Perfect Real Time）（製品コード RR036A）を用いて total RNA から cDNA を合成します。

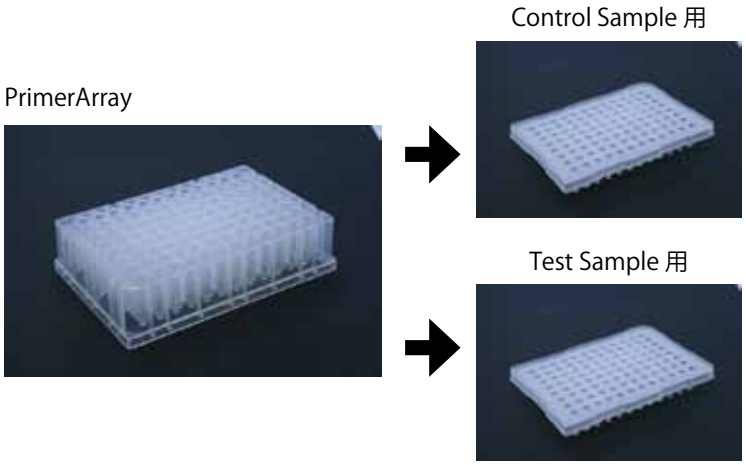
↓

リアルタイム PCR 反応液の分注（約 10 分）
合成した cDNA と SYBR® *Premix Ex Taq* II（Tli RNaseH Plus）（製品コード RR820A）を混合してマスターミックスを調製し、リアルタイム PCR 反応プレートに分注します。

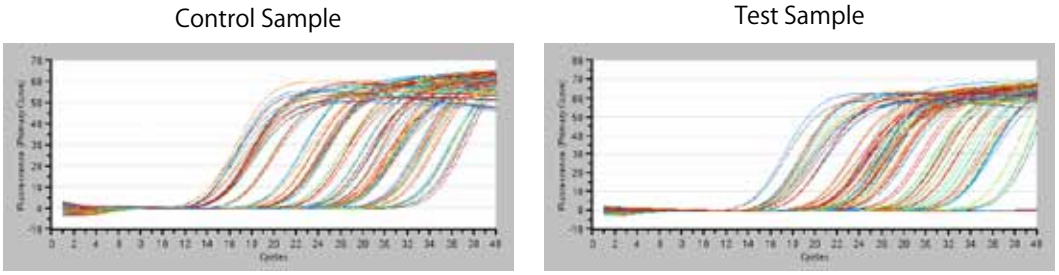


↓

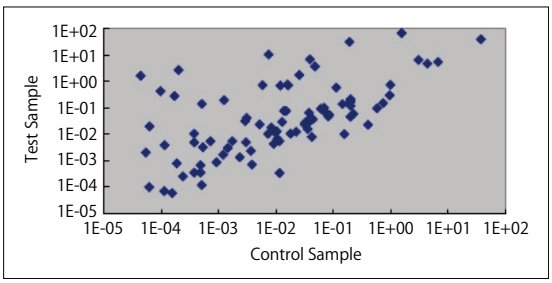
プライマーの添加（約 5 分）
8 連マルチチャンネルピペットなどを用いて、PrimerArray のプライマーをリアルタイム PCR 反応プレートに添加します。

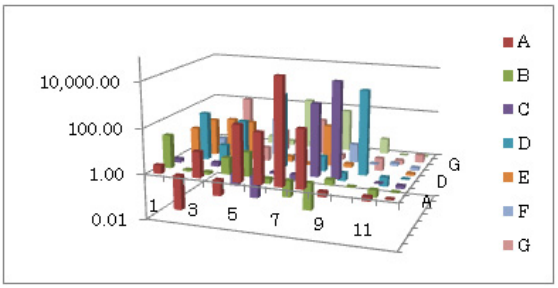


リアルタイム PCR（1 ～ 2 時間）
リアルタイム PCR 装置でリアルタイム PCR を実施します。



データ解析（約 30 分）
Ct 値を算出しΔΔCt 法により相対定量解析を行います。





I. 内容

PrimerArray Embryonic Stem Cells

幹細胞マーカー関連遺伝子検出用プライマー	50 μl × 88 ウェル
ハウスキーピング遺伝子検出用プライマー	50 μl × 8 ウェル

※ 各ウェルに Forward & Reverse primer mix（各 2.5 μM）が含まれる。
※ 25 μl 反応系の場合、約 12 反応分

＊ ラバーマット（フタ）は繰り返し使用しますので、取扱いにはご注意ください。
＊ プライマー情報は添付のプライマー情報リストでご確認ください。また、タカラバイオのウェブサイトから Excel 形式でダウンロードすることもできます。
http://www.takara-bio.co.jp/primerarray_tool2/

プライマー配置図

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
B	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
C	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36
D	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48
E	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
F	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72
G	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84
H	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96

幹細胞マーカー関連遺伝子検出用プライマー
ハウスキーピング遺伝子検出用プライマー

本製品以外に必要な試薬、機器（主なもの）

・リアルタイム PCR 装置
　Thermal Cycler Dice Real Time System *II*（製品コード TP900/TP960）など
・リアルタイム PCR 装置専用の反応プレートおよびシール
・8 連マルチチャンネルピペット、マイクロピペットおよびチップ
・プレート遠心機
・RNA 抽出試薬
　NucleoSpin® RNA II（製品コード 740955.10）、RNAiso Plus（製品コード 9108/9109）など
・DNase I
　Recombinant DNase I（RNase-free）（製品コード 2270A）など
・逆転写反応試薬
　PrimeScript RT Master Mix (Perfect Real Time)（製品コード RR036A）を推奨します。
・リアルタイム PCR 試薬
　SYBR® *Premix Ex Taq* II（Tli RNaseH Plus）（製品コード RR820A）をご使用ください。
・解析ツール
　PrimerArray Analysis Tool for Embryonic Stem Cells、または Multiplate RQ

II. 保存

－ 20℃

※ 適切に保存し、受取り後 1 年を目途にご使用ください。

※ 短期間（～ 1 ヵ月）に繰り返し使用する場合には 4℃で保存してください。ただし、本製品は防腐剤を含んでおりませんので、コンタミネーションには十分にご注意ください。

＊使用上の注意：
PrimerArray を－ 20℃で凍結保存している場合には、使用する前に冷凍庫から取り出し室温で溶解させます。その後、プライマー溶液の濃度が均一になるように、ラバーマット（フタ）が密着していることを確認した上で PrimerArray 全体を振って撹拌し、ウェル壁面の溶液を底に落とすためにプレート遠心機で軽くスピンダウンしておきます。PrimerArray を 4℃で冷蔵保存している場合には、使用する前に冷蔵庫から取り出し、同様にプライマー溶液を撹拌し、軽くスピンダウンしておきます。

III. 操作

＊ 本製品以外の試薬および装置の操作方法については各製品の取扱説明書も併せてご参照ください。

1. 準備

PrimerArray を－ 20℃で凍結保存している場合には、使用する前に冷凍庫から取り出し室温で溶解させます。その後、プライマー溶液の濃度が均一になるように、ラバーマット（フタ）が密着していることを確認した上で PrimerArray 全体を振って撹拌し、ウェル壁面の溶液を底に落とすためにプレート遠心機で軽くスピンダウンしておきます。
PrimerArray を 4℃で冷蔵保存している場合には、使用する前に冷蔵庫から取り出し、同様にプライマー溶液を撹拌し、軽くスピンダウンしておきます。

2. RNA 抽出

＊ RNA 取扱の一般的な注意事項に関しては、IV. Appendix の「1. RNA 取扱の注意事項」をご参照ください。

2-1. RNA サンプルの調製法

NucleoSpin® RNA II（製品コード 740955.10）や RNAiso Plus（製品コード 9108/9109）などの RNA 抽出キットを用いて、高純度の total RNA を調製してください。操作方法の詳細は、各製品の取扱説明書をご参照ください。RNA サンプルはゲノム DNA の除去を行った後、最終的に滅菌蒸留水または TE Buffer に溶解し、250 ng/μl となるように濃度調整して逆転写反応に用いてください。

2-2. ゲノム DNA の除去

total RNA サンプルには微量のゲノム DNA が混入していることがあります。ゲノム DNA も PCR の鋳型となりうるため、ゲノム DNA が混入した total RNA を鋳型として用いると解析結果が不正確になります。それを避けるために、DNase I 処理によりゲノム DNA を除去します。
NucleoSpin® RNA II（製品コード 740955.10）で RNA 調製を行う場合には、製品プロトコールに従ってカラム上で簡単に DNase I 処理を行うことができます。その他の方法で RNA を抽出した場合には、以下の方法で DNase I 処理を行います。

DNase I 処理によるゲノム DNA の除去

total RNA を抽出した後、Recombinant DNase I（RNase-free）（製品コード 2270A）により混入したゲノム DNA を分解します。反応後、DNase I は、熱処理またはフェノール／クロロホルム抽出により失活させ除去します。

（1）以下の反応液を調製する。

		（添加量等）
total RNA	x μl	20 ～ 50 μg
10 × DNase I Buffer	5 μl	1 ×
RNase Inhibitor（40 U/μl）	0.5 μl	20 U
Recombinant DNase I（RNase-free）	2 μl	10 U
DEPC 処理水	（42.5 − x） μl	50 μl に fill up

（2）37℃で 20 分間反応する。
（3）以下のいずれかの方法で DNase I を失活させる。

A. 熱処理
   1）2.5 μl の 0.5 M EDTA を加えて、80℃で 2 分間インキュベートする。
   2）DEPC 処理水で 100 μl に fill up する。

B. フェノール／クロロホルム抽出
   1）50 μl の DEPC 処理水と 100 μl のフェノール／クロロホルム／イソアミルアルコール（25：24：1）を加えて混合する。
   2）室温、15,000 rpm で 5 分間遠心し、上層を新しいチューブに移す。
   3）等量のクロロホルム／イソアミルアルコール（24：1）を加えて混合する。
   4）室温、15,000 rpm で 5 分間遠心し、上層を新しいチューブに移す。

（4）10 μl の 3 M 酢酸ナトリウムと 250 μl の冷エタノール（> 99%）を加えて氷上で 10 分間静置する。
（5）4℃、15,000 rpm で 15 分間遠心し、上清を捨てる。
（6）70% エタノールで沈殿を洗浄し、4℃、15,000 rpm で 5 分間遠心し、上清を捨てる。
（7）沈殿を乾燥させる。
（8）適当量の DEPC 処理水に溶解する。

3. 逆転写反応

「2. RNA 抽出」で調製した total RNA を鋳型として逆転写反応を行います。逆転写反応試薬は、PrimeScript RT Master Mix（Perfect Real Time）（製品コード RR036A）を推奨します。

（1）下記に示す逆転写反応液を氷上で調製する。

［1 反応分］

	使用量	最終濃度（または添加量）
5 × PrimeScript RT Master Mix	10 μl	1 ×
total RNA（250 ng/μl）	10 μl	2.5 μg
RNase Free dH_2O	30 μl	
Total	50 μl	

＊ 反応液量は必要に応じてスケールアップすることも可能です。

（2）逆転写反応を行う。

37℃、15 分（逆転写反応）
85℃、 5 秒（逆転写酵素を熱失活させる）
4℃

※ 以降の 4 ～ 6 の操作方法は、使用するリアルタイム PCR 装置によって異なります。ここでは、Thermal Cycler Dice Real Time System を用いる場合の操作方法を説明します。その他の機種を使用する場合には、IV. Appendix の「2. 各リアルタイム PCR 装置での使用方法」をご参照ください。

4. リアルタイム PCR 反応プレートの作製

ここではコントロールサンプルと 1 種類の未知サンプルの比較のため、2 枚のリアルタイム PCR 反応プレートを作製する場合を示します。反復実験数などに応じて適宜変更してください。

4-1. マスターミックスの調製と分注

「3. 逆転写反応」で調製した cDNA と SYBR® *Premix Ex Taq* II（Tli RNaseH Plus）（製品コード RR820A）を混合してマスターミックスを調製し、リアルタイム PCR 用のプレート（Control Sample 用および Test Sample 用）に分注します。

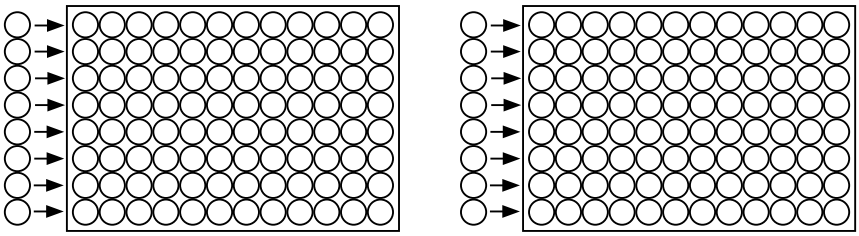
（1） コントロールサンプルの cDNA および未知サンプルの cDNA を用いて、下記に示すようにそれぞれのマスターミックス（PCR 反応液）を調製する。

	1 ウェル分	110 ウェル分
SYBR® *Premix Ex Taq* II（Tli RNaseH Plus）（2 ×）	12.5 μl	1,375 μl
cDNA 溶液（50 ng/μl ＊）	0.4 μl	44 μl
dH_2O（滅菌蒸留水）	8.1 μl	891 μl
Total	21 μl	2310 μl

＊：total RNA 相当量

（2） リアルタイム PCR 用プレートの各ウェルに 21 μl ずつ分注する。

8 連マルチチャンネルピペットを用いる場合の分注操作例
1）適当な 8 連の容器に、マスターミックスを 13 ウェル分（273 μl）ずつ分注する。
2）8 連のマルチチャンネルピペットでリアルタイム PCR 用プレートの各ウェルに 21 μl ずつ分注する。



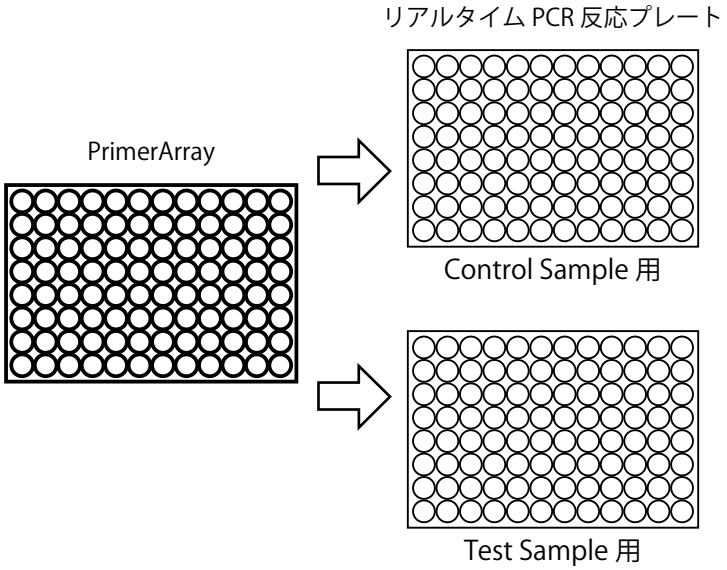
Control Sample 用　　Test Sample 用

4-2. プライマーの添加
マスターミックスを分注したリアルタイム PCR 用プレートに PrimerArray のプライマーを添加します。

（1）PrimerArray のラバーマットをはずす。
プライマー溶液が飛び散らないようにラバーマットを注意深くはずします。プライマー溶液が飛び散るとプライマー間のコンタミネーションの原因となりますので、ご注意ください。

＊ PrimerArray はプライマー溶液をよく混合し、プレートを軽くスピンダウンしてから使用してください。
＊ PrimerArray 使用後は、再びラバーマットでフタをして保存します。ラバーマットは捨てないでください。

（2）プライマーを分注する。
PrimerArray の各ウェルのプライマーをリアルタイム PCR プレートの対応するウェルに 4 μl ずつ分注します。



(3) リアルタイム PCR 用プレートに Sealing Film を貼る。
専用のヘラ（Plate Sealing Pad）を用いて確実に Sealing Film をプレートに密着させます。密着していない部分があるとリアルタイム PCR 反応中に Sealing Film がはがれて反応液が蒸発し、正確に測定できないことがあります。

※ これでリアルタイム PCR 反応プレートの調製は完了です。すぐにリアルタイム PCR を開始しない場合は、プレートを遮光して 4℃で保存してください。プレート調製後は、24 時間以内に反応を開始することをお勧めします。

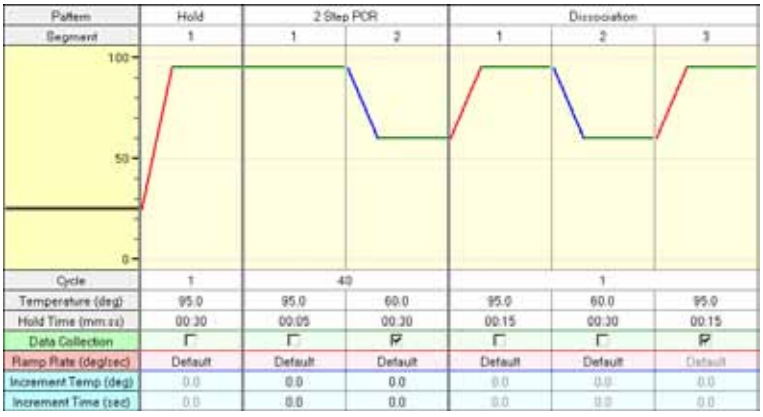
(4) PrimerArray にラバーマットでフタをする。
ラバーマットを確実にプレートに密着させます。確実に密着していないと PrimerArray 保存中のプライマー溶液の蒸発やコンタミネーションの原因となります。

5. リアルタイム PCR の実施

調製済みのリアルタイム PCR 反応プレートをリアルタイム PCR 装置にセットし、リアルタイム PCR を実施します。

(1) リアルタイム PCR プレートを軽く遠心して、ウェル壁面の水滴を落とし底部の気泡などを除く。
(2) リアルタイム PCR 装置に (1) のプレートをセットする。
(3) 以下の反応条件でリアルタイム PCR を行う。

初期変性
　95℃　30 秒
2 Step PCR
　95℃　 5 秒
　60℃　30 秒
　（40 サイクル）
融解曲線分析



6. データ解析

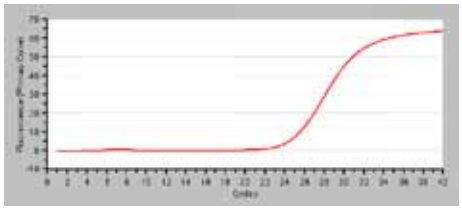
リアルタイム PCR 反応終了後、リアルタイム PCR 装置付属の解析ソフトウェアで Ct 値を算出します。その後、PrimerArray Analysis Tool for Embryonic Stem Cells または Multiplate RQ で相対定量解析を行います。

(1) 解析パラメーターの設定

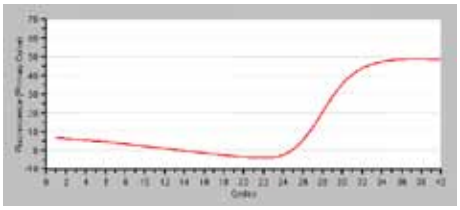
リアルタイム PCR 解析ソフトウェアでは、ほとんどの場合、解析パラメーターが自動で設定されますが、必ずその設定が正しいことを確認してください。

・ベースライン領域

増幅曲線が立ち上る手前のフラットな範囲をベースライン領域として設定します。ベースライン領域が広すぎると右下がりの増幅曲線になるなど、正しく補正されないことがあります。



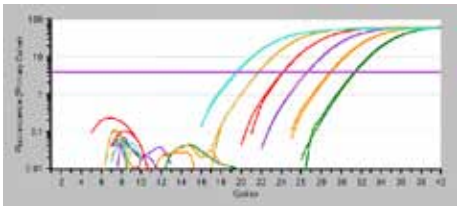
正しくベースラインが設定された例



ベースライン領域が広すぎる例

・Threshold（閾値）

PCR の指数関数的増幅域に設定します。増幅曲線の縦軸を対数（Log scale）で表示した際に、増幅曲線が直線になる範囲が指数関数的増幅域に相当します。



正しく Threshold（閾値）が設定された例

(2) Ct 値と Tm 値の算出

Ct 値と Tm 値はリアルタイム PCR 解析ソフトウェアにより自動的に算出されます。

(3) データの出力

PrimerArray Analysis Tool for Embryonic Stem Cells で相対定量解析を行う場合には、Ct 値を Excel 形式または CSV 形式で出力します＊。Multiplate RQ で解析する場合には、ランファイルをそのまま使用しますので Ct 値を出力する必要はありません。なお、Multiplate RQ で解析できるのは、Thermal Cycler Dice Real Time System で取得したデータのみです。その他の装置で取得したデータは Multiplate RQ では解析できません。

＊ リアルタイム PCR 解析ソフトウェアによっては、サンプル情報が設定されていないウェルや解析から除外（Omit）したウェルのデータ行は出力されないことがあります。そのような状態では、PrimerArray Analysis Tool for Embryonic Stem Cells へのデータ入力の際に誤りが生じやすくなりますので、全ウェルのデータが表示される状態で出力を行ってください。

(4) 相対定量解析

未知サンプルにおける各遺伝子の発現量をコントロールサンプルに対する相対量として算出します。解析手順の詳細は、PrimerArray Analysis Tool for Embryonic Stem Cells または Multiplate RQ の説明書をご参照ください。

PrimerArray Analysis Tool for Embryonic Stem Cells の解析例

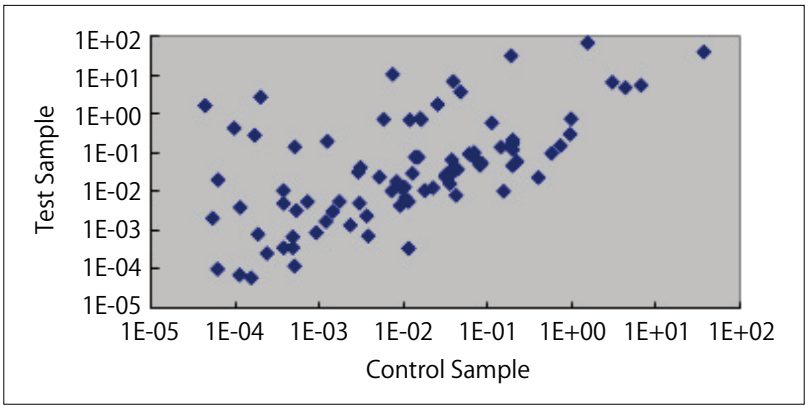
コントロールサンプルと 1 種類の未知サンプルを比較して、Scatter Plot と Fold Difference の 3D Profile をグラフ表示します。

・Scatter Plot

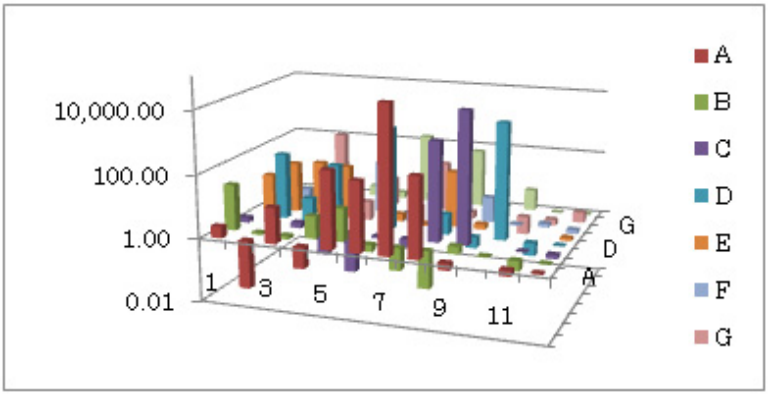
コントロールサンプルの発現量を横軸に、未知サンプルの発現量を縦軸にプロットしたグラフです。

・3D Profile

コントロールサンプルを 1 とした場合の未知サンプルの発現量（Fold Difference）を表示したグラフです。



Scatter Plot

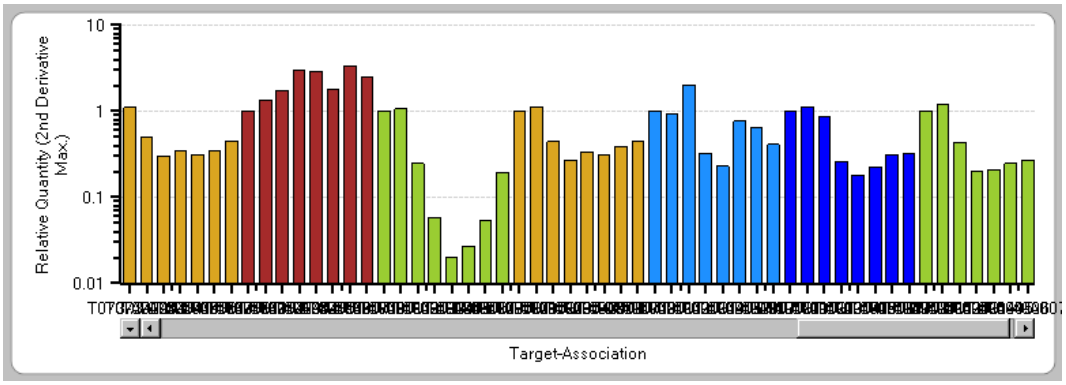


3D Profile（Fold Change）

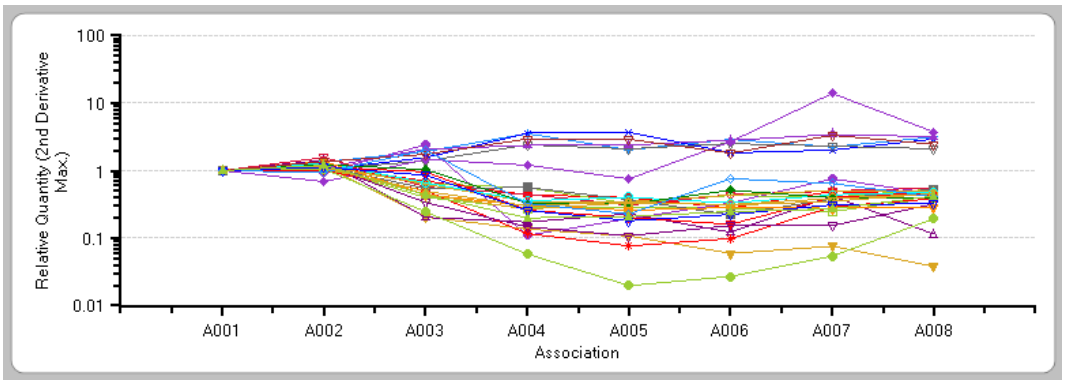
Multiplate RQ の解析例

コントロールサンプルと複数種類の未知サンプルを比較して、相対定量値を棒グラフ（Relative Quantity Chart）または折れ線グラフ（Gene Profile）で表示します。

Relative Quantity Chart



Gene Profile



IV. Appendix

1. RNA 取扱の注意事項

純度の高い RNA サンプルを得るためには、細胞内に含まれる RNase の作用を抑えること、また使用する器具や溶液など外部からの RNase の混入を避けることが大切です。RNA 調製にあたっては、実験者の汗や唾液に含まれる RNase の混入を防ぐため作業中は不必要に話さず、清潔なディスポーザブルグローブを着用し、RNA 調製専用の実験台を設けるなどの細心の注意を払ってください。

【器具】

実験器具に関しては、可能な限りディスポーザブルのプラスチック製品を使用してください。一般のガラス器具は以下の処理の（1）あるいは（2）を行ってから使用してください。

（1）乾熱滅菌（180℃、60 分）

（2）ガラス器具を 0.1% ジエチルピロカーボネート（DEPC）溶液で、37℃ , 1 時間処理する。残留 DEPC を除去するためにオートクレーブ処理（120℃、30 分）する。

RNA 実験に用いる器具（プラスチックおよびガラス）は、他の器具と区別して RNA 専用として用いることをお勧めします。

【溶液】

実験に用いる試薬溶液は、上記の条件で乾熱滅菌（180℃、60 分）あるいは DEPC 処理したガラス器具で調製し、蒸留水はあらかじめ 0.1% DEPC 処理を行いオートクレーブしてください。溶液、蒸留水はすべて RNA 実験専用としてお使いください。

2. 各リアルタイム PCR 装置での使用方法

＊各機種の取扱説明書に従って操作してください。

＊実験操作の詳細や注意事項は、「III. 操作」をご参照ください。

【Applied Biosystems 7300/7500 Real-Time PCR System（Life Technologies 社）】

（1）ぞれぞれの cDNA を用いて、下記に示すマスターミックス（PCR 反応液）を調製する。

	1 ウェル分	110 ウェル分
SYBR® *Premix Ex Taq* II（Tli RNaseH Plus）（2 ×）	25 μl	2750 μl
ROX Reference Dye or Dye II（50×）＊1	1 μl	110 μl
cDNA 溶液（50 ng/μl）＊2	0.8 μl	88 μl
dH_2O（滅菌蒸留水）	15.2 μl	1672 μl
Total	42 μl	4620 μl

＊1：Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System では ROX Reference Dye II を、7300 Real-Time PCR System では ROX Reference Dye を使用します。

＊2：total RNA 相当量

（2）リアルタイム PCR 用プレートの各ウェルに 42 μl ずつ分注する。

（3）（2）のプレートに PrimerArray の各ウェルのプライマーを 8 μl ずつ添加する。

（4） 以下の反応条件でリアルタイム PCR を行う。

初期変性
　95℃　　30 秒
2 Step PCR
　95℃　　5 秒
　60℃　　31 or 34 秒 ＊3
　（40 サイクル）
融解曲線分析

＊ 3：7300 では 31 秒に、7500 では 34 秒に設定する。

【Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System（Life Technologies 社）】

（1） それぞれの cDNA を用いて、下記に示すマスターミックス（PCR 反応液）を調製する。

	1 ウェル分	110 ウェル分
SYBR® *Premix Ex Taq* II（Tli RNaseH Plus）（2 ×）	10 μl	1100 μl
ROX Reference Dye II（50 ×）	0.4 μl	44 μl
cDNA 溶液（50 ng/μl） ＊1	0.4 μl	44 μl
dH_2O（滅菌蒸留水）	6 μl	660 μl
Total	16.8 μl	1848 μl

＊ 1：total RNA 相当量

（2） リアルタイム PCR 用プレートの各ウェルに 16.8 μl ずつ分注する。
（3） （2） のプレートに PrimerArray の各ウェルのプライマーを 3.2 μl ずつ添加する。
（4） 以下の反応条件でリアルタイム PCR を行う。

初期変性
　95℃　　30 秒
2 Step PCR
　95℃　　3 秒
　60℃　　30 秒
　（40 サイクル）
融解曲線分析

V. 関連製品

・PrimeScript® RT Master Mix（Perfect Real Time）（製品コード RR036A）
・SYBR® *Premix Ex Taq*™ II（Tli RNaseH Plus）（製品コード RR820A/B）
・リアルタイム PCR 装置
　Thermal Cycler Dice® Real Time System *II*（製品コード TP900）
　Thermal Cycler Dice® Real Time System *II* MRQ（製品コード TP960）
　Thermal Cycler Dice® Real Time System Single（製品コード TP850）
　Thermal Cycler Dice® Real Time System Single MRQ（製品コード TP870）
・96well Hi-Plate for Real Time（製品コード NJ400）
・Sealing Film for Real Time（製品コード NJ500）
・NucleoSpin® RNA II（製品コード 740955.10/.50/.250）
・RNAiso Plus（製品コード 9108/9109）
・Recombinant DNase I（RNase-free）（製品コード 2270A/B）

○ 個別プライマーの購入方法
　PrimerArray に搭載されたプライマーは、すべて個別にご購入いただけます。専用の注文書＊にプライマー情報リストに記載の Primer Set ID と必要事項を記入してご注文ください。通常納期は、受注後、5 営業日です。
　＊：タカラバイオウェブカタログの本製品の製品ページでダウンロードできます。

○ Perfect Real Time サポートシステム（http://www.takara-bio.co.jp/realtime/）
　SYBR® Green I 検出によるリアルタイム RT-PCR 用プライマーをオンラインで簡単に検索・ご注文いただけるシステムです。ヒト、マウス、ラット、ウシ、イヌ、ニワトリの RefSeq 登録遺伝子に対して網羅的に設計済みです。

VI. 参考文献

1）吉崎美和 , 向井博之（2005）実験医学別冊 バイオ実験で失敗しない！「検出と定量のコツ」, 第 3 章 核酸の検出と定量のコツ 4. リアルタイム定量 PCR のコツ、120-126
2）吉崎美和 , 向井博之（2008）実験医学別冊 原理からよくわかる「リアルタイム PCR 実験ガイド」[3] 1）リアルタイム RT-PCR 法による遺伝子発現解析 , 39-43

VII. 注意

・本製品は研究用として販売しております。ヒト、動物への医療、臨床診断用には使用しないようご注意ください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。
・タカラバイオの承認を得ずに製品の再販・譲渡、再販・譲渡のための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。
・ライセンスに関する最新の情報は弊社ウェブカタログをご覧ください。
・SYBR® は Molecular Probe Inc. の登録商標です。その他本説明書に記載されている会社名および商品名などは、各社の商号、または登録済みもしくは未登録の商標であり、これらは各所有者に帰属します。

製品についての技術的なお問い合わせ先
TaKaRa テクニカルサポートライン
Tel 077-543-6116　Fax 077-543-1977
ホームページアドレス http://www.takara-bio.co.jp/

タカラバイオ株式会社

v201209Da